

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Martina Andrijević

**Sinteza novog fluorescentnog indikatora za određivanje  
koncentracije selenija**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Martina Andrijević

**Sinteza novog fluorescentnog indikatora za određivanje  
koncentracije selenija**

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji

Neposredna voditeljica: Andrea Dandić, asistentica

Osijek, 2019.

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Kemija**

**SINTEZA NOVOG FLUORESCENTNOG INDIKATORA ZA ODREĐIVANJE  
KONCENTRACIJE SELENIJA**

**Martina Andrijević**

**Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji

**Sažetak:**

U ovome radu opisana je priprava spoja **7a**,: 5,6-diamino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona, u svrhu selektivnog kompleksiranja i fluorescentne kvantifikacije koncentracije selenija. Kao polazni spoj u sintezi spoja **7a** odabran je 4-brom-1,8-naftalanhidrid (**1**). Prvi korak podrazumijevao je prevođenje spoja **1**, reakcijom s odgovarajućim primarnim aminima, u njegove imidne derivate (**2a**, **2b** i **2c**). Za provođenje daljnjih sintetskih koraka korišten je jedan od pripremljenih imidnih derivata, spoj **2a**. Slijedeći korak podrazumijevao je reakciju spoja **2a** s natrijevim azidom što je rezultiralo supstitucijom broma azidnom skupinom, nakon čega slijedi redukcija azidne skupine u amino skupinu (**4a**). Daljnji sintetski koraci obuhvaćaju halogeniranje aromatskog sustava reakcijom spoja **4a** s bromnom vodom čime se htjelo postići selektivno uvođenje broma na *ortho* položaj u odnosu na već prisutnu amino skupinu (**5a**). Nakon toga slijedi supstitucija broma azidnom skupinom (**6a**) te u konačnici redukcija novo uvedene azidne skupine u amino skupinu (**7a**). Strukture većine spojeva pretpostavljene su IR spektroskopijom i/ ili  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom.

**Diplomski rad obuhvaća:** 37 stranica, 36 slika, 7 shema, 19 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** 1,8-naftalimid/nukleofilna aromatska supstitucija/fluorescentni indikator

**Rad prihvaćen:** 30.9.2019.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. doc. dr. sc. Marija Jozanović

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Chemistry**

**Graduate Study of Chemistry**

**Scientific Area: Natural Sciences**

**Scientific Field: Chemistry**

**SYNTHESIS OF THE NEW FLUORESCENCE INDICATOR FOR DETERMINATION OF  
SELENIUM CONCENTRATION**

**Martina Andrijević**

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji

**Abstract:**

In this diploma thesis synthesis of compound **7a**, 5,6-diamino-2-propyl-1H-benzo [de] isoquinoline-1,3 (2H)-dione is described. The purpose of synthesis of this compound is selective complexation and fluorescent quantification of selenium concentration. As starting compound in this synthesis 4-bromo-1,8-naphthalanhdride was used (**1**). In first step compound **1** reacts with different primary amines to give imide derivatives, compounds **2a**, **2b** and **2c**. In the following steps only compound **2a** was used as a starting material for preparation of target compound, compound **7a**. Compound **2a** reacts with sodium azide and this step is including substitution of bromine with azido group (**3a**). Azido group of compound **3a** was reduced to amino group by introduction of hydrogen sulfide into reaction mixture (**4a**). The following step involved halogenation of compound **4a** by reaction with bromine water to achieve introduction of bromine in *ortho* position to amino group (**5a**). Compound **5a** by reaction with sodium azide gave compound **6a** and finally azido group of compound **6a** was reduced by introduction of hydrogen sulfide into reaction mixture to give target compound, **7a**. The structures of most compounds were assumed by IR spectroscopy and/or NMR spectroscopy ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ).

**Thesis includes:** 37 pages, 36 pictures, 7 schemes, 19 references

**Original in:** croatian

**Keywords:** 1,8-naphthalimide/nucleophilic aromatic substitution/fluorescent indicator

**Thesis accepted:** 30.9.2019.

**Reviewers:**

1. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. doc. dr. sc. Marija Jozanović

**Thesis deposited in:** Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

## Sadržaj

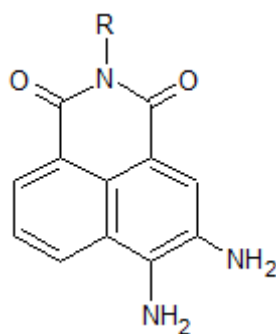
1. Uvod.....	1
2. Literaturni dio .....	2
2.1. Selenij (Se) .....	2
2.2. Selenij u organizmu .....	3
2.3. Utjecaj selenija na okoliš i njegova toksičnost.....	3
2.4. Metode određivanja selenija.....	4
2.5. Elektrofila aromatska supstitucija .....	6
2.5.1. Halogeniranje benzena .....	7
2.6. Nukleofilna aromatska supstitucija .....	9
3. Eksperimentalni dio.....	12
3.1. Materijali i metode.....	12
3.1.1 Materijali.....	12
3.1.2. Metode karakterizacije.....	12
3.2. Sinteza .....	13
3.2.1. Priprava 6-brom-2-propil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2a), 6-brom-2-heksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2b) i 6-brom-2-cikloheksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3(2H)-diona (2c) .....	13
3.2.2. Priprava 6-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (3a).....	15
3.2.3. Priprava 6-amino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (4a) .....	16
3.2.4. Priprava 6-amino-5-brom-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-dion-a (5a) .....	18
3.2.5. Priprava 6-amino-5-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (6a) .....	18
3.2.6. Priprava 5,6-diamino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (7a) .....	19
4. Rezultati i rasprava .....	20

4.1. Priprava 6-brom-2-propil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2a), 6-brom-2-heksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2b) i 6-brom-2-cikloheksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3(2H)-diona (2c) .....	22
4.2. Priprava 6-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (3a) .....	23
4.3. Priprava 6-amino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (4a).....	23
4.4. Priprava 6-amino-5-brom-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-dion-a (5a) .....	24
4.5. Priprava 6-amino-5-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (6a) .....	25
4.6. Priprava 5,6-diamino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (7a).....	26
5. Zaključak.....	27
6. Literaturni izvori .....	28
7. Prilozi .....	30

# 1. Uvod

Selenij (Se) je element u tragovima koji u niskim koncentracijama djeluje kao važan mikroelement u živim organizmima, a u visokim koncentracijama može biti toksičan. Najčešće korištena metoda za određivanje selenija je atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) no njezin nedostatak je vrlo skupa instrumentacija. Alternativna metoda određivanja koncentracije selenija je fluorometrija uz korištenje fluorescentnih indikatora koji selektivno formiraju fluorescentni kompleks sa selenijem, ove metode su razvijene u vrijeme kada instrumentacija za AAS metode nije bila dovoljno razvijena i bila je dostupna samo u specijaliziranim i vrlo dobro opremljenim laboratorijima. S razvojem modernih instrumenata za mjerenje fluorescencije i njihovom širokom dostupnosti i primjenom, nastaje i potreba za daljnim razvojem analitičkih metoda za određivanje selenija. Postojeći indikatori nisu dovoljno selektivni i osjetljivi da bi se AAS metoda mogla zamijeniti fluorometrijom.

U ovome radu opisana je sinteza novog indikatora za selektivno kompleksiranje i fluorescentnu kvantifikaciju koncentracije selenija. Kao polazni spoj odabran je 4-brom-1, 8-naftalinanhidrid koji se u prvom koraku prevodi u imid, pomoću primarnih amina. Dušik imidne skupine povećava delokalizirani  $\pi$  sustav i stvara spoj koji ima dobra fluorescentna svojstva. Mijenjanjem svojstva substituenata na dušiku primarnog amina direktno utječemo na vodotopivost planiranog spoja. Krajnji cilj rada podrazumijeva uvođenje 2 vicinalne amino skupine na naftolni prsten za kompleksiranje Se (IV), koji se veže na nevezne elektronske parove dušikovih atoma te je intenzitet fluorescencije razmjeran koncentraciji selenija (Slika 1.).



Slika 1. Struktura ciljnog produkta.

## 2. Literaturni dio

### 2.1. Selenij (Se)

Selenij je nemetal koji se u periodnom sustavu elementa nalazi u 16. skupini, simbol mu je Se, a atomski broj 34. Selenij se pojavljuje u više alotropskih modifikacija od kojih su najpoznatije u obliku crvenog amornog praha i sivih kristala koji se još naziva i „metalni selenij“ (Slika 2.) [1].



Slika 2. Alotropske modifikacije selenija.

Selenij ima dobra fotovodljiva svojstva pa se koristi u elektronici za fotoćelije, mjerače svjetlosti i solarne ćelije. Ovaj element našao je svoju primjenu i u industriji stakla; za uklanjanje boje iz stakla, za dodavanje crvene boje staklu i dr., a osim toga može se koristiti u pigmentima i za toniranje. Selenij se koristi u legurama olova koje se koriste u baterijama i ispravljačima struje. Osim primjene u elementarnom stanju, selenij u spojevima također ima svoju primjenu. Od spojeva selenija tu se izdvaja natrijev selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) koji se primjenjuje u dodacima prehrani [1].

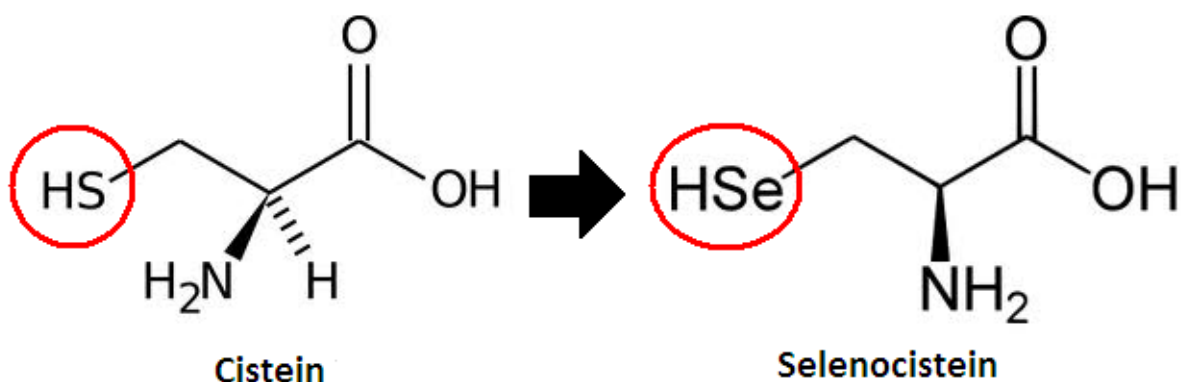
Selenij postoji u prirodi u vrlo malim količinama, a nastaje prirodnim procesima i ljudskim djelovanjem. Antropogeni izvori selenija su posljedica gnojenja poljoprivrednih zemljišta, jer se Se nalazi kao element u tragovima u fosfatnih gnojivima.



U prirodi se selenij može pronaći i u mineralima gdje se nalazi zajedno sa metalima kao što su bakar, cink i olovo [1].

## 2.2. Selenij u organizmu

Selenij je izuzetno važan mikroelement širokog spektra biološkog djelovanja. Unatoč malim koncentracijama u tijelu selenij ima nekoliko funkcija u organizmu: katalitičku, strukturnu te regulatornu i aktivira djelovanje mnogih enzima, vitamina, hormona i tako osigurava normalno funkcioniranje različitih bioloških sustava, provođenje brojnih fizioloških i biokemijskih reakcija u organizmu. Selenij u organizmu tvori selenoproteine koji sadrže selenocisteinski ostatak (Slika 3.) u aktivnom mjestu proteina, odnosno enzima. Takvi proteini su: glutathion peroksidaza, tioredoksin reduktaza, dejodinaza, selenoprotein P i dr. Glutathion peroksidaze kataliziraju redukciju vodikovog peroksida i ostalih organskih hidroperoksida i tako štiti organizam od reaktivnih kisikovih spojeva. Selenoprotein P uključen je u transport selenija u različita tkiva štiteći pri tome organizam od teških metala [2].



Slika 3. Struktura selenocisteina koji se nalazi u sastavu selenoproteina.

## 2.3. Utjecaj selenija na okoliš i njegova toksičnost

Djelovanje selenija u okolišu ovisi o interakcijama sa drugim spojevima i uvjetima u okolišu. Selenij se može nagomilati u živim organizmima i može biti prenesen kroz hranidbeni lanac, to se događa kada životinje pojedu puno biljaka koje su apsorbirale selenij. Kada životinje akumuliraju velike količine selenija to može uzrokovati reproduktivne probleme i urođene mane [1].

Toksičnost se može okarakterizirati kao akutna ili kronična, a simptomi ovise o tome koji je spoj selenija izazvao trovanje. Snažan miris sličan češnjaku koji je obično prisutan i kod

akutnih i kroničnih trovanja prisutan je kod trovanja dimetilselenidom. Rani znakovi akutne toksičnosti uključuju hipotenziju i tahikardiju. Kronično trovanje selenijem, ili selenoza, uključuje promjene na noktima i alopecije. Ostale značajke mogu uključivati mučninu, povraćanje, proljev, umor i lezije na koži. Kako napreduje selenoza, može doći do smanjenja kognitivnih funkcija, slabosti, paralize i smrti. Kada dođe do trovanja bitno sprečavanje daljnjeg izlaganja [3].

## 2.4. Metode određivanja selenija

Za određivanje koncentracije selenija (ng / g) u biološkim tkivima može se koristiti niz analitičkih metoda. Oni uključuju fluorometriju, atomsku apsorpciju spektroskopiju (AAS), induktivno spregnuta plazma-atomska emisijska spektroskopija (ICP-AES), induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija (ICP-MS), plinska kromatografija (GC) i druge.

Klasična AAS nema dovoljno niske granice detekcije da bi mogla određivati selenij u biološkim uzorcima zbog toga se određivanje selenija u uzorcima krvi, mesa, voća i povrća koristi AAS sa generiranjem hidrida (HGAAS) [4].

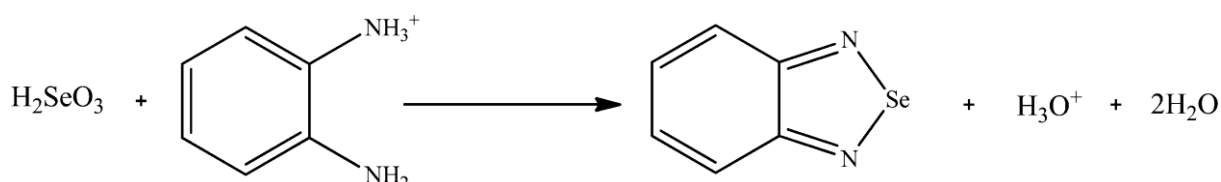
Atomska apsorpcijska spektroskopija sa grafitnom peći (GFAAS) je vrlo osjetljiva metoda i može detektirati  $5 \cdot 10^{-11}$  g Se/ g uzorka. Ova metoda zasniva se na činjenici da neki spojevi metala reagiraju sa spojevima selenija i tvore refraktorne metalne selenide. Kako bi omogućili termalnu stabilizaciju selenija uzorku se dodaju elementi poput nikla, molibdena i platine, organski materijal se potom razara na velikoj temperaturi prije atomizacije uzorka. To je jedna od prednosti ove metode, jer se uzorak kemijski tretira *in situ* te nema potrebe za pripremom uzorka za analizu [5].

GFAAS se može modificirati dodatkom dušične kiseline, nikla i platine u grafitnu peć pa je tada atomizacija elektrotermalna (EAAS). Dodatak nikla smanjuje spektralne interferencije fosfata u biološkim uzorcima urina. Za uzorke ljudske krvne plazme i seruma granica detekcije EAAS metode je 0,8 µg / L [6].

Prednost HGAAS su smanjene kemijske interferencije, ali nedostatak te metode je što zahtijeva veće količine uzoraka od GFAAS-a tehnike. HGAAS se koristi za određivanje selenija u uzorcima hrane. Za pripremu uzoraka koristi se mokra digestija (pomoću dušične i perklorne kiseline) da bi uništili organsku tvar. Redukcija Se (VI) u Se (IV) je potrebna prije upotrebe natrijevog borhidrida da bi se reducirao sav prisutan selen u selenijev hidrid koji se potom termalno raspada pri 200°C i atomizira [7, 8].

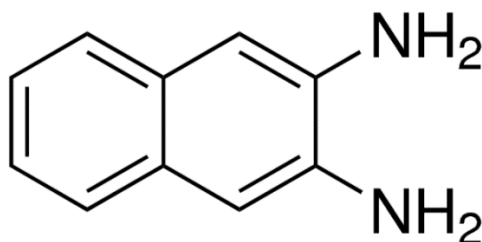
ICP-AES sa stvaranjem hidridnih para se može koristiti za određivanje ukupnog seleno u biološkim uzorcima. Ova je tehnika posebno prikladna za analizu malih uzoraka. Uzorci se spaljuju na temperaturama do 310°C uz dodatak dušične, sumporne i perklorne kiseline. Nakon tretiranja s klorovodičnom kiselinom, selenij se reducira sa natrijevim borhidridom u selenovodik ( $\text{H}_2\text{Se}$ ). Granica detekcije za ovu metodu je 0,4  $\mu\text{g} / \text{L}$  [9].

Primjena plinsko-tekućinske kromatografije (GLC) omogućuje uklanjanje interferencija iz bioloških matriksa. Uzorak se prvo tretira sa dušičnom kiselinom pri čemu se raspada, a mjeri se količina piazselenola nastala reakcijom selenija (IV) sa odgovarajućim reagensom u kiselom mediju. Za određivanje selenija plinskom kromatografijom sa detektorom hvatačem elektrona koristi se 1,2-diaminobenzen kao indikator za stvaranje piazselenola (Slika 4.). Ako se kao indikator rabi 1,2-diamino-3,5-dibrombenzen granica detekcije iznosi  $1 \cdot 10^{-9} \text{ g (Se)/g}$  (uzorak) [10].



Slika 4. Nastajanje piazselenola sa 1,2-diaminobenzenom u kiselom mediju.

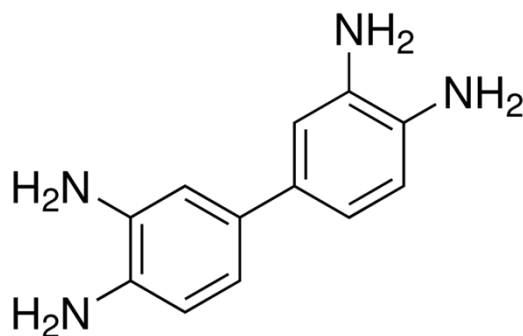
Fluorimetrija se također može koristiti za određivanje selenija i to uz primjenu pogodnih indikatora, jer selenij sam ne fluorescira, ali može formirati komplekse (piezselenole) koji fluoresciraju i čiji intenzitet fluorescencije ovisi o koncentraciji selenija. Takvi indikator i uglavnom imaju dvije vicinalne amino skupine koje mogu vezati selenij. Takvi indikator i su 2,3-diaminonaftalen (DAN) i 3,3-diaminobenzidin (DAB) (Slika 5. i 6.) [11].



Slika 5. Struktura DAN-a.

DAN veže selenij u kompleks koji se iz kisele otopine može ekstrahirati u organsko otapalo. Fluorimetrijsko određivanje zahtijeva digestiju uzorka kako bi se razorila organska

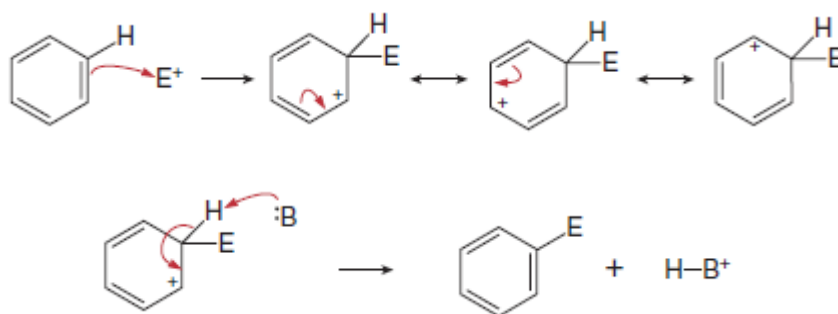
materija i potom redukciju uzorka kako bi se selenij preveo u Se (IV). Ova metoda primjenjiva je i na male uzorke koje sadrže male količine selenija, a granica detekcije iznosi 50 ppb [11].



Slika 6. Struktura DAB-a.

## 2.5. Elektrofilna aromatska supstitucija

Elektrofilna aromatska supstitucija (EAS) je reakcija u kojoj aromatski spoj reagira sa elektrofilnom skupinom i pri tome se funkcijska skupina reaktanta supstituira elektrofilom. Aromatski prsten izuzetno je stabilan i bogat elektronima stoga može reagirati s elektrofilom. U ovakvim reakcijama vodikov atom sa aromatskog prstena zamjenjuje se elektrofilom. EAS se odvija u dva koraka: adicija elektrofila pri čemu nastaje karbokation stabiliziran rezonancijom nakon čega slijedi deprotoniranje bazom. (Slika 7.) [12].

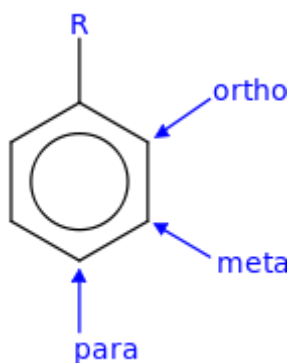


Slika 7. Općeniti mehanizam EAS.

Adicija elektrofila ( $E^+$ ) formira novu vezu ( $C - E$ ) sa elektronima iz  $\pi$  elektronskog sustava pri čemu nastaje karbokation koji je stabiliziran rezonancijom, u ovom koraku se gubi aromatičnost. U drugom koraku baza uklanja proton sa C atoma i ponovno se uspostavlja aromatičnost. Benzenski prsten ovakvim mehanizmom reagira sa halogenima, alkil halidima, acil halidima,  $SO_3$  i  $HNO_3$ .

Kako bi došlo do reakcije potrebno je generirati elektrofil pomoću katalizatora kao što su  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeBr}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{AlCl}_3$  koji su Lewisove kiseline i koje polariziraju reaktant pri čemu on postaje elektrofilan te može „napasti“ benzenski prsten [12].

Kada su za benzenski prsten vezani supstituenti njihova prisutnost određuje položaj na benzenskom prstenu na kojemu dolazi do slijedeće supstitucije elektrofilom. Priroda skupine prisutne na aromatskom prstenu utječe i na reaktivnost slijedeće supstitucije. Već prisutni supstituenti na benzenskom prstenu mogu utjecati na aktivnost benzenskog prstena tako da će povećati ili smanjiti njegovu reaktivnost za EAS. Prema tome razlikujemo aktivirajuće skupine koje povećavaju reaktivnost aromatskog prstena u odnosu na benzen i deaktivirajuće skupine koje smanjuju reaktivnost aromatskog prstena u odnosu na benzen. Jake elektron-donorske skupine kao što su primjerice:  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NHCOR}$ ,  $-\text{R}$  su aktivirajuće skupine a jake elektron-akceptorske skupine kao što su  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{COR}$ ,  $-\text{COOR}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{[NR}_3\text{]}^+$  su deaktivirajuće skupine. Kao što je prethodno spomenuto vrsta i priroda već prisutnog supstituenta na benzenskom prstenu određuje i položaj na kojemu će doći do slijedeće supstitucije. Stoga jake elektron donorske skupine usmjeravaju slijedeću supstituciju u *ortho/para* položaj dok jake elektron-akceptorske skupine usmjeravaju slijedeću supstituciju u *meta* položaj (Slika 8.) [12].

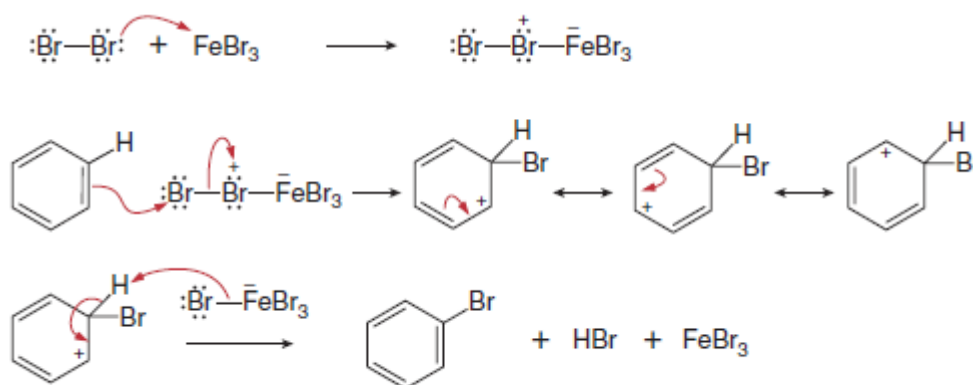


Slika 8. Moguća mjesta vezanja supstituenta.

### 2.5.1. Halogeniranje benzena

Halogeniranje benzena jedna je od reakcija elektrofilne aromatske supstitucije. Prilikom halogeniranja benzenski prsten reagira sa halogenim elementom ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{F}_2$ ,  $\text{I}_2=\text{X}_2$ ) u prisutnosti Lewisove kiseline ( $\text{FeX}_3$ ) kao katalizatora koja ima ulogu generiranja elektrofila. Reakcijom nastaje aril-halogenid (klorbenzen ili brombenzen). Lewisova kiselina ima ulogu polarizacije  $\text{X-X}$  veze te nastaje  $\text{X}^+$  za supstituciju sa protonom.

Adicijom elektrofila nastaje C-X veza pri čemu se generira karbokation stabiliziran rezonancijom. U ovoj reakciji dolazi do nastanka i  $\text{FeX}_4^+$  koji u sljedećem koraku uklanja proton sa benzenskog prstena te se ponovno uspostavlja aromatičnost, a katalizator izlazi nepromijenjen iz reakcije (Slika). Kao nusprodukt nastaje HX. Halogeniranje je sintetski korisno jedino sa  $\text{Cl}_2$  i  $\text{Br}_2$  (Slika 9.), jer je  $\text{F}_2$  jako reaktivan i reakcija je burna, a sa  $\text{I}_2$  je reakcija prespora [12].



Slika 9. Mehanizam bromiranja.

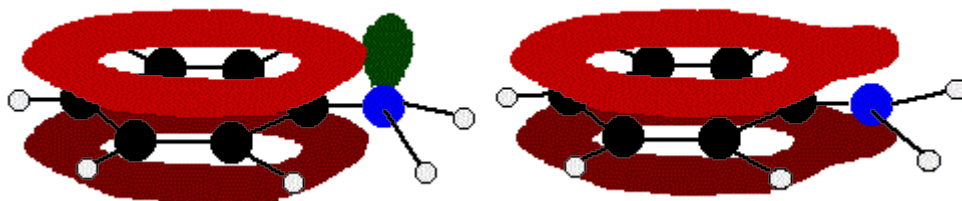
Literaturno je poznato kako  $\text{NH}_2$  skupina vezana za benzenski prsten u anilinu ( $\text{Ar-NH}_2$ ) čini prsten mnogo reaktivnijim nego što bi to inače bio. Anilin će reagirati s vodenom otopinom broma (bromna voda) na hladnom i bez prisutnosti bilo kakvog katalizatora. Amino skupina usmjerava elektrofilnu aromatsku supstituciju u *ortho* i *para* položaj pa se Br u ovoj reakciji veže na 3 mjesta u prstenu (Slika 10.) [13].



Slika 10. Reakcija anilina s bromnom vodom bez katalizatora.

Neaktivirani benzenski prstenovi reagirat će s bromom samo uz katalizator. Nevezni elektronski par na dušiku koji se nalazi u nehibridiziranoj p orbitali dodiruje delokalizirane  $\pi$  elektrone prstena i postaje delokaliziran s njima (Slika 11.). Na ovaj način povećana je elektronska gustoća i prsten je reaktivniji. Ako se u anilin doda bromna voda ona se obezboji i nastaje bijeli talog.

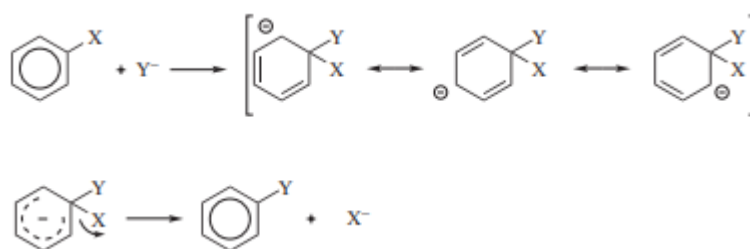
Analogno tome, u ovome radu provedeno je bromiranje već aktiviranog aromatskog sustava koji u svojoj strukturi sadrži NH<sub>2</sub> skupinu kao jaku elektron donirajuću skupinu [13].



Slika 11. Delokalizirani elektroni anilina.

## 2.6. Nukleofilna aromatska supstitucija

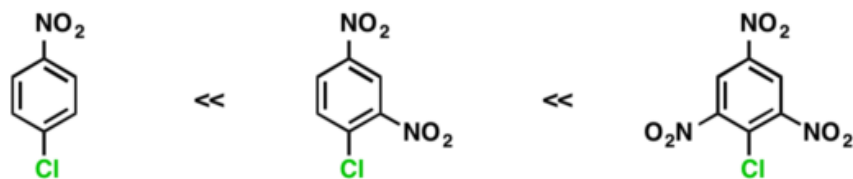
Mehanizam nukleofilne aromatske supstitucije (S<sub>N</sub>Ar) sastoji se od dva koraka; napada nukleofila na ugljikov atom aromatskog prstena (taj ugljik sadrži odlaznu skupinu) nakon čega slijedi eliminacija odlazne skupine i regeneracija aromatskog prstena (Slika 12.) [14].



Slika 12. Općeniti mehanizam S<sub>N</sub>Ar.

Nukleofil se veže za prsten čime se gubi aromatičnost, nastaje intermedijer, a zatim se ponovno uspostavlja aromatičnost kada se eliminira odlazna skupina. Korak koji određuje brzinu reakcije je napad nukleofila na benzenski prsten. Kako bi došlo do ove reakcije važno je da je nukleofil jak, zbog toga što je benzenski prsten bogat elektronima i izuzetno stabilan. Položaj odlazne skupine na prstenu određuje gdje će doći do supstitucije [14].

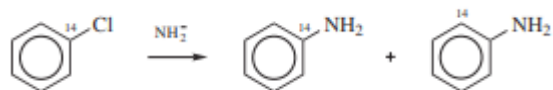
Supstituenti imaju utjecaj na reaktivnost aromatskog spoja za S<sub>N</sub>Ar pa se reaktivnost povećava ako su na prsten vezane elektron odvlačeće skupine (deaktivirajuće), što je više takvih skupina vezanih na prsten reakcija će biti brža. Primjerice, S<sub>N</sub>Ar sa 2,4-dinitrofenil klorida je oko 10<sup>5</sup> puta brža od nukleofilne aromatske supstitucije sa *p*-nitrofenil kloridom (Slika 13.). Za razliku od EAS, gdje postoje *ortho*, *para* i *meta* usmjerivači, u S<sub>N</sub>Ar položaj na kojem dolazi do supstitucije određuje odlazna skupina [14].



Slika 13. Različito supstituirani fenil kloridi..

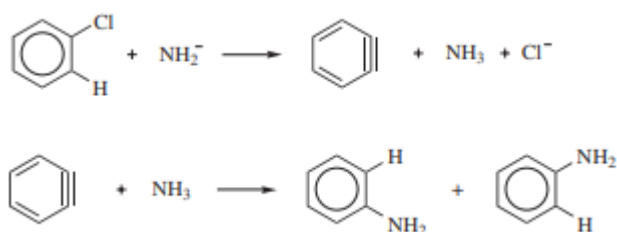
Azidi su zbog negativnog naboja na dušikovom atomu izuzetno jaki nukleofili koji se mogu koristiti u reakcijama  $S_NAr$ . Naftalimidi koji su supstituirani sa halogenom su pogodni reaktanti za reakciju s azidom u nukleofilnoj aromatskoj supstituciji [15].

Za  $S_NAr$  aril halogenide koji nemaju aktivirajućih skupina potrebna je jaka baza, a osim toga nukleofil se nužno ne veže samo za mjesto odlazne skupine nego i na druga mjesta u prstenu. Na primjer, reakcijom klorbenzena sa kalijevim amidom ( $KNH_2$ ) amidna skupina se veže na mjesto klora i na mjesto do klora u benzenskom prstenu (Slika 14) [14].



Slika 14.  $S_NAr$  klorbenzena.

Ova pojava može se objasniti mehanizmom koji se sastoji od dva koraka; eliminacija odlazne skupine i adicija nukleofila. U prvom koraku baza uklanja *ortho* vodikov atom i dolazi do eliminacije odlazne skupine te nastaje benzinski intermedijer. Zatim se u drugom koraku  $NH_3$  veže na jedno od dva mjesta na benzinu (Slika 15) [14].



Slika 15. Mehanizam  $S_NAr$  klorbenzena.



Intermedijer koji nastaje u drugom koraku naziva se benzin. To je vrlo reaktivan spoj i zbog toga ga se ne može izolirati u normalnim uvjetima, nego postoji samo kao intermedijer nekih reakcija kao što su  $S_NAr$  ili Diels-Alderova reakcija. Aromatičnost ovog spoja nije narušena, jer su dodatna 2 elektrona smještena iznad u  $\pi$  orbitali iznad dva ugljikova atoma. Trostruka veza ne postoji zapravo, nego je prava struktura hibrid dvije rezonantne strukture (Slika 16.) [14].



Slika 16. Rezonantne strukture benزيدina.

# 3. Eksperimentalni dio

## 3.1. Materijali i metode

### 3.1.1 Materijali

Za izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada korišteni su slijedeći spojevi i otapala. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

- 4-brom-1,8-naftalinhidrid, 95% (J&K Scientific GmbH, Njemačka)
- Propilamin, 99+%, extra pure (Acros organics, Francuska)
- Heksilamin, 99% (Acros organics, Kina)
- Cikloheksilamin, 99% (Acros organics, Taiwan)
- Etanol, bezvodni (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Etil-acetat (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Heksan (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Diklormetan (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Natrijev azid (BDH Prolabo, Ujedinjen kraljevstvo)
- N,N-dimetilformamid, Extra dry (Acros organics, USA)
- Željezov (II) sulfid, taljen (Kemika, Zagreb)
- Klorovodična kiselina (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Silica gel 60 (Macherey-nagel, Njemačka)
- Natrijev sulfat, bezvodni (Gram-mol, Zagreb)

### 3.1.2. Metode karakterizacije

#### 3.1.2.1. FTIR

FTIR spektri svih spojeva snimljeni su na instrumentu Shimadzu FTIR 8400S na sobnoj temperaturi pri rezoluciji od 1 nm u refleksijskoj ćeliji DRS-8000A (P/N 206-62301-91) metodom difuzijske reflektancije. Praškasti uzorak (1 mg) izmiješan je sa KBr (20 mg) i stavljen u držač uzorka te je provedeno mjerenje.

#### 3.1.2.2. NMR

$^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker Avance III HD 400 MHz na sobnoj temperaturi pri 400 MHz i 100 MHz u deuteriranom dimetilsulfoksidu kao otapalu

(DMSO-d<sub>6</sub>). Spektri su snimljeni na način da je 10 mg uzorka otopljeno u 500 µL DMSO-d<sub>6</sub> (C=0.02 mg/ µL). Za snimanje <sup>13</sup>C NMR spektra korištena je DEPTQ tehnika.

## 3.2. Sinteza

U sintezama je korišteno različito stakleno posuđe i kemijski pribor, a od instrumenata su korišteni:

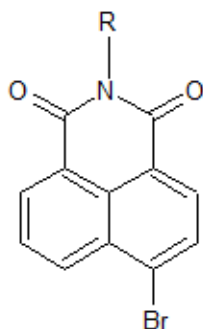
- Magnetska mješalica (IKA, USA)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex, Njemačka)
- Rotacijski vakuum uparivač (Heidolph, Njemačka)

Tijek reakcija, kontrola čistoće i preliminarna identifikacija dobivenih produkata provodila se tankoslojnom kromatografijom na pločicama silikagela (60 F, 254, 0,25 mm, *Fluka*). Vizualizacija je provedena apsorpcijom UV zračenja pri 254 i 366 nm i prskanjem ninhidrinom uz naknadno zagrijavanje. Produkti su pročišćavani ekstrakcijom i kromatografijom na stupcu silikagela. Za kromatografiju na stupcu silicagela i tankoslojnu kromatografiju korišten je sustav otapala etil-acetat/heksan u omjeru 1:3.

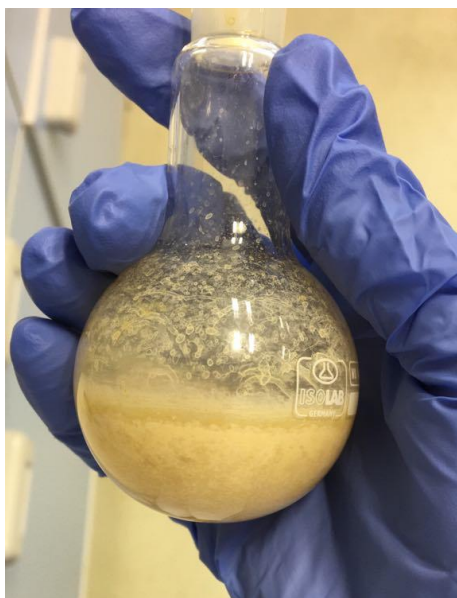
### 3.2.1. Priprava 6-brom-2-propil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2a), 6-brom-2-heksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2b) i 6-brom-2-cikloheksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3(2H)-diona (2c)

Kao polazni spoj za sintezu korišten je 4-brom-1,8-naftalanhidrid (1 g) koji je otopljen u bezvodnom etanolu (18 mL) nakon čega je u otopinu dodan primarni amin u 20%-tnom suvišku te je reakcijska smjesa refluksirana 24 h u okrugloj tikvici sa povratnim hladilom uz miješanje na magnetskoj mješalici i uz korištenje klor-kalcijeve cjevčice. U sintezama su korištena tri amina: propilamin (0,368 mL), heksilamin (0,548 mL) i cikloheksilamin (0,492 mL). Boja reakcijske smjese na početku je svjetlo smeđe boje i mutna je, a dodatkom primarnog amina mijenja boju u bistru tamnosmeđu u reakciji sa sva tri amina. Tijek reakcije praćen je pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) na pločicama silikagela (Sustav otapala etil-acetat/heksan=1:3). Nakon završetka reakcije, otapalo je otpareno na rotacijskom vakuum uparivaču uz sniženi tlak pri čemu svjetlo smeđi produkti **2a**, **2b** i **2c** kristaliziraju; R<sub>f</sub>(R=Pr)=0,714 (Sustav otapala etil-acetat/heksan=1:3) , R<sub>f</sub>(R=Hex)=0,765 (Sustav otapala etil-acetat/heksan=1:3), R<sub>f</sub>(R=Cy)=0,762 (Sustav otapala etil-acetat/heksan=1:3) (Slika 18.). Tako dobiveni sirovi produkt **2a** (687 mg, 59%) koji je prema TLC-u pokazao najbolju čistoću

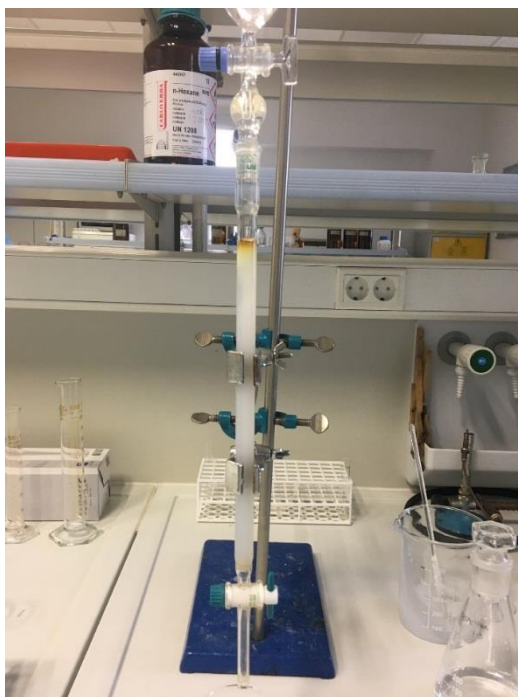
i iskorištenje reakcije pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela (Etil-acetat/heksan=1:3) (Slika 19.) te je snimljen FTIR spektar spoja **2a** i polaznog spoja **1**.



Slika 17. Strukturna formula spojeva **2a**, **2b** i **2c** (a; R=Pr, b; R=Hex, c; R=Cy).



Slika 18. Kristalizirani spoj **2a**.

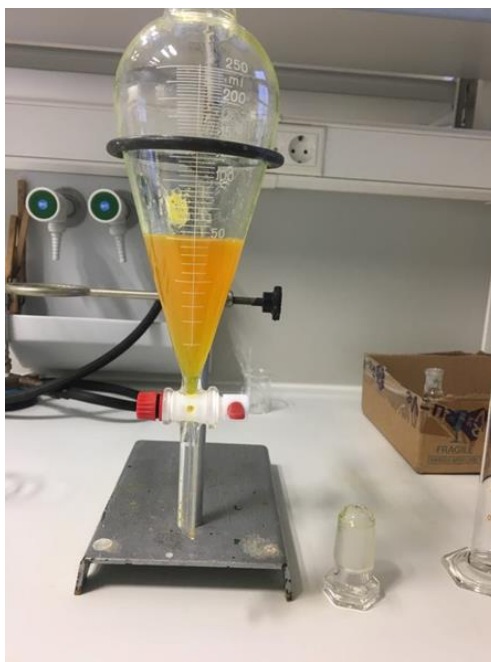


Slika 19. Pročišćavanje spojeva **2a**, **2b** i **2c**.

### 3.2.2. Priprava 6-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (**3a**)

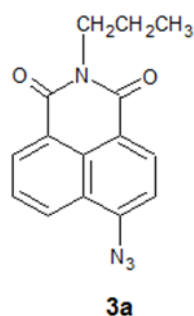
Spoj **2a** (687 mg,) je otopljen u suhom dimetilformamidu (DMF) (17,5 mL) te je u tikvicu dodan  $\text{NaN}_3$  (1,404 g). Dodano je deset puta veća množina  $\text{NaN}_3$  od **2a** a volumen DMF-a je izračunat iz podataka topljivosti za **2a** (2g topivo u 50 mL).

Reakcijska smjesa miješana je oko 2 h na temperaturi  $80^\circ\text{C}$  sa klor-kalcijevom cjevčicom na vrhu tikvice. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na pločicama silikagela (Etil-acetat/heksan=1:3). Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je razrijeđena sa 30 mL vode, prilikom čega se boja reakcijske smjese iz prvotne tamno smeđe boje u žutu (Slika 20.).



Slika 20. Reakcijska smjesa sa dodatkom vode prije ekstrakcije.

Reakcijska smjesa ekstrahira se tri puta sa obrocima od 30 mL etil-acetata, a potom se organski sloj ispere vodom i suši sa  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Poslije sušenja,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  se odvoji filtracijom, a etil-acetat se otpari prilikom čega kristalizira smeđi produkt **3a** (855 mg);  $R_f=0,628$  (Sustav otapala Etil-acetat/heksan=1:3). Za slijedeći korak korak korišten je sirovi produkt **3a** bez pročišćavanja kromatografijom na stupcu. Struktura spoja **3a** pretpostavljena je tankoslojnom kromatografijom (Etil-acetat/heksan=1:3) i IR spektroskopijom.

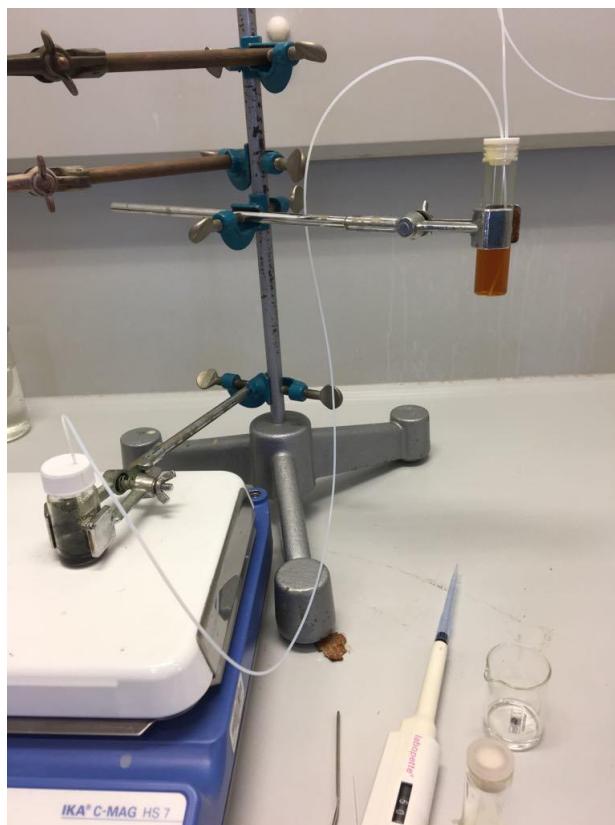


Slika 21. Strukturna formula spoja **3a**.

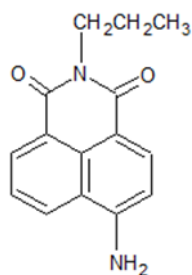
### 3.2.3. Priprava 6-amino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (**4a**)

Spoj **3a** (855 mg) otopljen je u etanolu (13 mL) a pripremljenoj otopini dovođen je  $\text{H}_2\text{S}$  koji je generiran reakcijom željezovog(II)sulfida (1,34 g) i 14%-tne  $\text{HCl}$  (7,4 mL) (Slika 22.). Reakcija

je provedena u trajanju od 24 h, nakon čega je etanol otparen na rotacijskom vakuum uparivaču uz sniženi tlak. Izoliran je tamno smeđi produkt, spoj **4a** (159 mg, 20,52 %);  $R_f=0,111$  (Sustav otapala Etil-acetat/heksan=1:3). Struktura spoja **4a** pretpostavljena je tankoslojnom kromatografijom (Etil-acetat/heksan=1:3) i IR spektroskopijom.



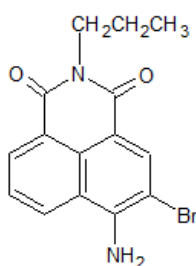
Slika 22. Aparatura za redukciju uvođenjem  $H_2S$  u reakcijsku smjesu.



Slika 23. Strukturna formula spoja **4a**.

### 3.2.4. Priprava 6-amino-5-brom-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-dion-a (5a)

Produkt **4a** (0,159 g) otopljen je u etanolu (26 mL) te je u otopinu dodana voda (1 mL) i Br<sub>2</sub> (34 µl) u 10%-tnom suvišku, reakcijska smjesa miješana je u zatvorenoj tikvici na magnetskoj miješalici tijekom noći. Po završetku reakcije etanol je otparen na rotacijskom vakuum uparivaču uz sniženi tlak, dobiven je smeđi produkt (109 mg). Na temelju tankoslojne kromatografije; R<sub>f</sub>=0,190 (Etil-acetat/heksan=1:3) pretpostavljeno je da je nastao željeni produkt ,spoj **5a** kojeg smo karakterizirali FTIR i NMR spektroskopijom.



Slika 24. Strukturna formula spoja **5a**.

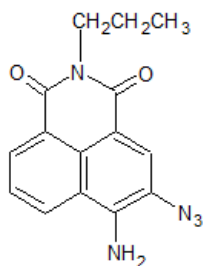
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ / ppm: 0,89 (t, 3H, 3-pr), 1,60 (q, 2H, 2-pr), 3,91-3,95 (m, 2H, 1-pr), 7,41 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,69 (dd, 1H, H-2, J=8,38 Hz, 7,39 Hz), 8,28 (s, 1H, H-4), 8,40 (dd, 1H, H-3, J=7,27 Hz, 0,77 Hz), 8,72 (dd, 1H, H-1, J=8,46 Hz, 0,73 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO) δ / ppm: 11,85, 21, 37, 41,39, 101,97, 109,88, 120,44, 122,49 , 125,80, 128,68, 129,85, 131,40, 136,19, 149,02, 162,55, 163,84.

### 3.2.5. Priprava 6-amino-5-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (6a)

Priprava spoja **6a** provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2. Produkt **5a** (109 mg) otopljen je u suhom DMF-u (5 mL) te je u tikvicu dodan NaN<sub>3</sub> (0,213 g). Reakcijska smjesa je grijanja na temperaturi od 80°C tijekom 2 sata uz korištenje klor-kalcijeve cjevčice. Nakon završetka reakcije u reakcijsku smjesu dodana je voda (30 mL) te je smjesa ekstrahirana sa etil-acetatom (3 puta po 30 mL). Nakon sušenja sa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etil acetat je otparen na rotacijskom vakuum uparivaču uz sniženi tlak. Na temelju tankoslojne kromatografije R<sub>f</sub>=0,247 (Sustav otapala Etil-acetat/heksan=1:3) pretpostavljeno je kako je izolirani produkt traženi produkt, spoj **6a**.

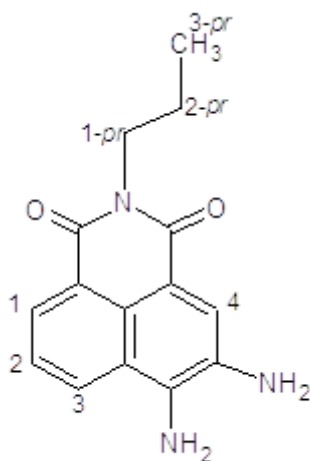




Slika 25. Strukturna formula spoja **6a**.

### 3.2.6. Priprava 5,6-diamino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (**7a**)

Produkt **6a** (94 mg,) je otopljen u etanolu (12,5 mL). Redukcija je provedena analogno postupku opisanom u poglavlju 3.3. U predkomoru je dodan FeS (0,257 g) i 14%-tna HCl (1,424 mL). Reakcija se provodila tijekom noći te je sljedeći dan iz reakcijske smjese otparen etanol na rotacijskom vakuum uparivaču uz sniženi tlak. Na temelju tankoslojne kromatografije,  $R_f=0,237$  (Sustav otapala Etil-acetat/heksan=1:3) pretpostavljeno je kako izolirani produkt traženi produkt spoj **7a**.

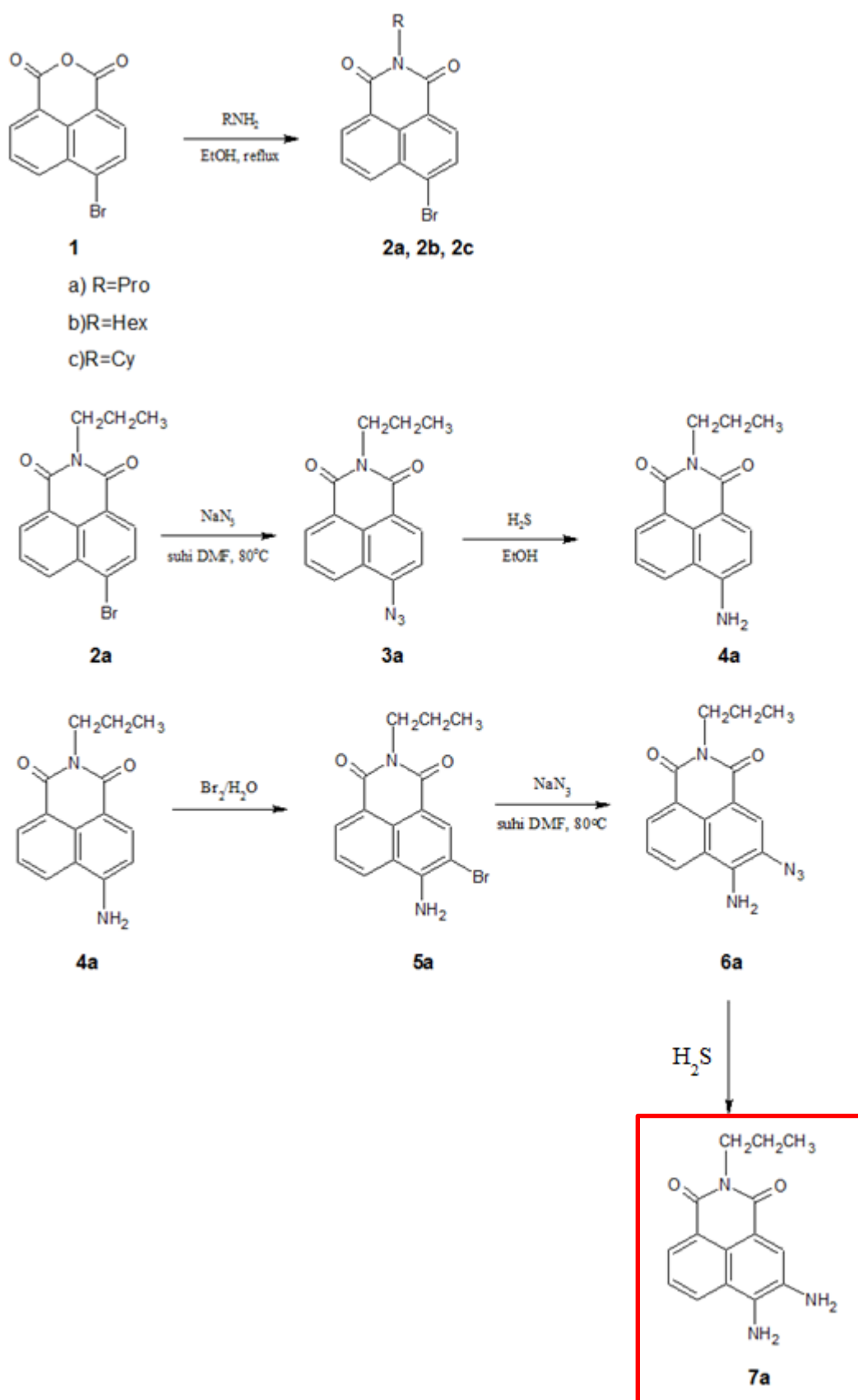


Slika 26. Pretpostavljen strukturna formula ciljnog produkta **7a**.

# 4. Rezultati i rasprava

Ciljni produkt, spoj **7a** (5,6-diamino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-dion) sintetiziran je u svrhu dobivanja novog indikatora za određivanje koncentracije selenija. Planirani spoj ima dvije vicinalne amino skupine koje mogu kompleksirati selenij, a takav kompleks fluorescira, intenzitet fluorescencije ovisi o količini vezanog selenija stoga se iz toga može odrediti koncentracija selenija u uzorku. Polazni spoj za sintezu je 4-brom-1,8-naftalinhidrid, a sinteza se sastojala od 6 koraka (Shema 1.):

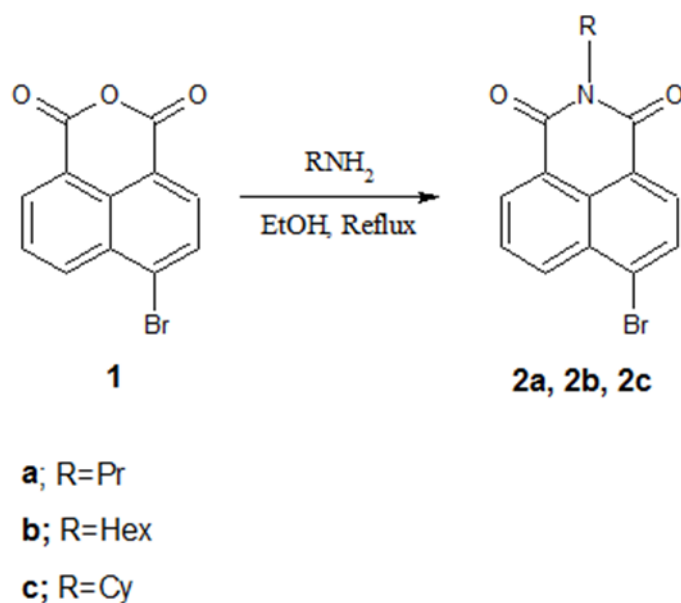
1. Priprava supstituiranog cikličkog imida iz 4-brom-1,8-naftalinhidrida i primarnih amina u etanolu (EtOH) uz reflux
2. Aromatska nukleofilna supstitucija sa  $\text{NaN}_3$  uz zagrijavanje u suhom dimetilformamidu (DMF)
3. Redukcija azidne skupine u slobodnu amino skupinu u etanolu (EtOH) uvođenjem  $\text{H}_2\text{S}$
4. Bromiranje sa bromnom vodom
5. Aromatska nukleofilna supstitucija sa  $\text{NaN}_3$  uz zagrijavanje u suhom dimetilformamidu (DMF)
6. Redukcija azidne skupine u slobodnu amino skupinu u etanolu (EtOH) uvođenjem  $\text{H}_2\text{S}$ .



Shema 1. Prikaz planiranog sintetskog puta za pripravu ciljnog produkta, spoja **7a**.

#### 4.1. Priprava 6-brom-2-propil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2a), 6-brom-2-heksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3 (2H)-diona (2b) i 6-brom-2-cikloheksil-1H-benzo [de]izokinolin-1,3(2H)-diona (2c)

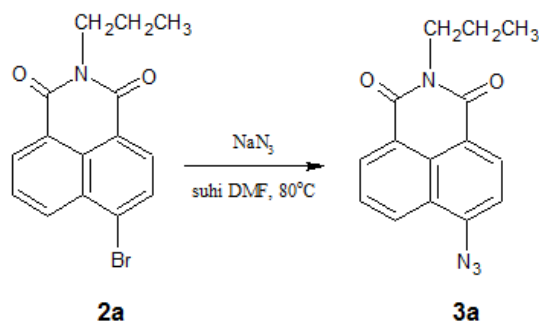
Reakcijom spoja **1** s odgovarajućim primarnim aminima dolazi do sinteze imidnih derivata, spojeva **2a**, **2b** i **2c** (Shema).



Shema 2. Priprava spojeva **2a**, **2b** i **2c**.

Pripravljeni su spojevi **2a**, **2b** i **2c** prema postupku opisanom u poglavlju 3.2. koji je literaturno poznat [16]. Ciljni produkt sadrži supstituiranu imidnu skupinu koja nastaje reakcijom cikličkog anhidrida s primarnim aminom u suvišku u etanolu. Reakcija s propilaminom pokazala je najbolji prinos i dobiveni su najčišći reaktanti, stoga je ostatak sintetskog puta nastavljen samo sa produktom **2a**. Snimljen je FTIR spektar početnog spoja (Slika 28.) i produkta **2a** (Slika 29.) iz čega je zaključeno da je željeni produkt nastao. Na FTIR spektru početnog spoja vidljivo je istezanje Br skupine vezane za aromatsku jezgru pri 1020  $\text{cm}^{-1}$ , te simetrične i asimetrične vibracije karbonilnih skupina ( $\text{C}=\text{O}$ ) pri 1780 i 1730  $\text{cm}^{-1}$ . FTIR spektar spoja **2a** sadrži pikove za simetrične i asimetrične vibracije imidne skupine pri 3067 i 3220  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2. Priprava 6-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (3a)

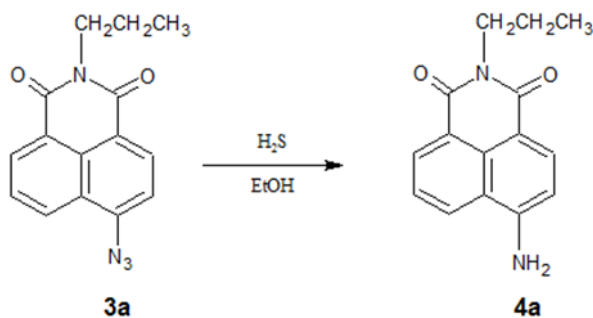


Shema 3. Priprava spoja **3a**.

U ovom koraku reakcije provedena je aromatska nukleofilna supstitucija spoja **2a** sa natrijevim azidom. Nukleofilna aromatska supstitucija specifična je zbog toga što su za nju potrebni jaki reakcijski uvjeti. Kao nukleofil je odabran natrijev azid, koji zbog jake nukleofilnosti ima sposobnost istisnuti brom, koji izlazi kao odlazna skupina [15]. Azidna skupina je uvedena budući da ju je lako reducirati u jaku aktivirajuću amino skupinu u sljedećem koraku.

U FTIR spektru spoja **3a** (Slika 30.) vidljiv je jak pik u području od 2180-2170  $\text{cm}^{-1}$  što je karakteristično za asimetrično istezanje azida, osim toga na spektru se ne vidi pik koji je karakterističan za istezanje C-Br veze. Iz toga se da zaključiti da je došlo do supstitucije broma s azidom na aromatskom prstenu.

#### 4.3. Priprava 6-amino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (4a)

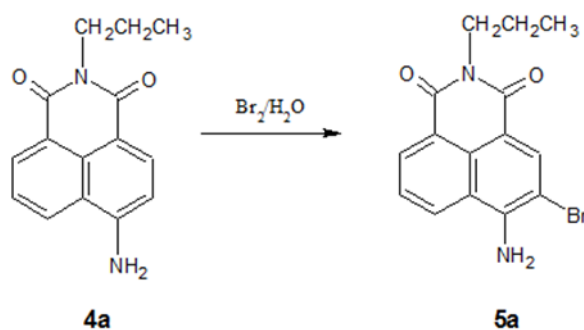


Shema 4. Priprava spoja **4a**.

U ovom koraku sinteze bilo je potrebno provesti selektivnu redukciju azidne skupine, a da pri tome ostale skupine ostanu nepromijenjene.

Literaturno je poznata redukcija azidne skupine sa  $\text{H}_2\text{S}$  [17]. Takva redukcija provedena je i u slučaju redukcije spoja **3a** generiranjem  $\text{H}_2\text{S}$  i njegovim izravnim uvođenjem u reakcijsku smjesu. U FTIR spektru spoja **3a** vidljivo je da pik karakterističan za azide kao što je prethodno objašnjeno, više nije prisutan u spektru spoja **4a** (Slika 30.), na istoj slici jasno se vide apsorpcijski pikovi na  $3200$  i  $3500\text{ cm}^{-1}$  koji se pripisuju se simetričnom istezanju amino skupine vezane za aromatsku jezgru.

#### 4.4. Priprava 6-amino-5-brom-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-dion-a (**5a**)



Shema 5. Priprava spoja **5a**.

Konačni cilj ovoga rada jeste priprava spoja koji će u svojoj strukturi sadržavati dvije vicinalne amino skupine. Spoj **4a** u svojoj strukturi sadrži amino skupinu prema tome slijedeći korak podrazumijevao bi uvođenje amino skupine u *ortho* položaj u odnosu na već prisutnu amino skupinu.

Jedan od najčešćih načina uvođenja amino skupine na aromatski sustav jeste njegovo nitriranje nakon čega slijedi redukcija nitro skupine [18]. Budući da je nitriranje aromatskog prstena reakcija koja se provodi u kiselim reakcijskim uvjetima ovakva reakcija rezultirala bi protoniranjem amino skupine. Protoniranje amino skupine dovelo bi do prevođenja amino skupine kao jake elektron-donorske skupine u elektron-akceptorsku skupinu. Na ovaj način protonirana amino skupina bi bila *meta* usmjerivač a *ortho* produkt bi nastao u znatno manjem prinosu. Jedan od mogućih načina za izbjegavanje ovakve reakcije jeste uvođenje zaštitne skupine za amino skupinu, no budući da je najčešći način zaštite amino skupine njezino prevođenje u kvaterne amonijeve soli, karbamate, amide ili imide [19]. Takav način zaštite ponovno bi rezultirao prevođenjem amino skupine kao elektron-donorske u elektron-akceptorsku skupinu. Na ovaj način zaštićena amino skupina bi ponovno usmjeravala daljnju

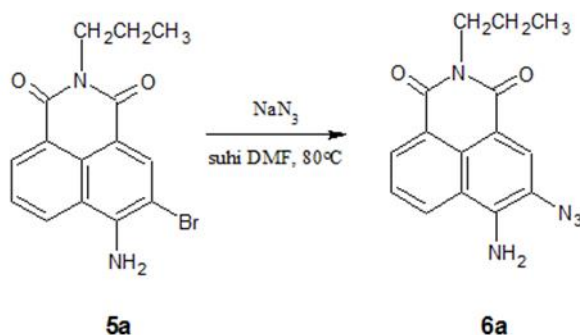
supstituciju u *meta* položaj. Prema tome u ovome radu provedeno je bromiranje aromatskog sustava kako je prikazano u shemi 5.

Kao što je prethodno navedeno (poglavlje 2.6.) bromiranje benzenskog prstena koji sadrži slobodnu amino skupinu može se provesti bez prisustva katalizatora budući da amino skupina aktivira benzenski prsten prema EAS. Kada se u otopinu tako aktiviranog spoja doda bromna voda dolazi do njezinog obezbojenja i stvaranja bijelog taloga. Uvođenje broma trebalo je biti selektivno budući da bi ciljni produkt trebao sadržavati vicinalne amino skupine zbog čega je u prethodnim koracima uvedena amino skupina kao jaka aktivirajuća skupina. Prisutnost amino skupine usmjerava slijedeću supstituciju u *ortho* ili *para* položaj dok bi imidna skupina trebala usmjeravati supstituciju u *meta* položaj. Iz toga se može zaključiti da postoji mogućnost vezanja broma na više mjesta na naftolnom prstenu, ali preferirani položaj je *ortho* položaj u odnosu na amino skupinu zbog jakog aktivirajućeg utjecaja NH<sub>2</sub> skupine.

Analizom FTIR spektra (Slika 31.) nije uočen karakterističan pik za brom vezan na aromatski prsten, zbog toga je ovaj produkt karakteriziran <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom. Unatoč tome daljnja sinteza je provedena po shemi 1.

#### 4.5. Priprava 6-amino-5-azido-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (6a)

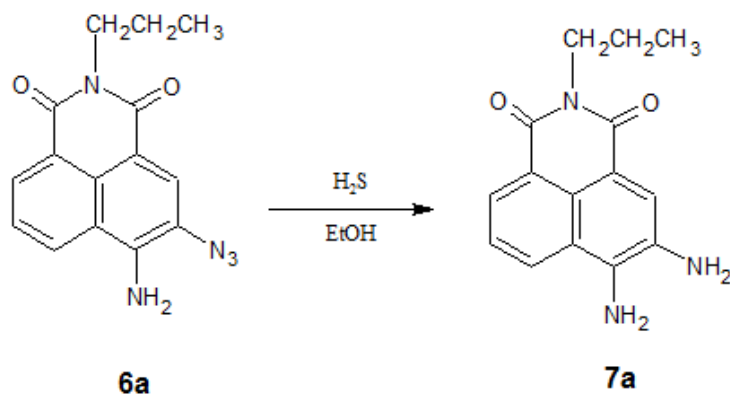
Priprava spoja **6a** provedena je reakcijom spoja **5a** s NaN<sub>3</sub> u suhom DMF-u. U ovome koraku provedena je nukleofilna aromatska supstitucija analogno pripravi spoja **3a** kako je opisano u poglavlju 2.7. i 3.6. Uvođenje broma na *ortho* položaj u odnosu na već prisutno amino skupinu u prethodnom koraku, provedeno je iz razloga što se na ovaj način dobiva dobra izlazna skupina za nukleofilnu supstituciju koja je provedena u ovom koraku.



Shema 6. Priprava spoja **6a**.

#### 4.6. Priprava 5,6-diamino-2-propil-1H-benzo [de] izokinolin-1,3 (2H)-diona (7a)

Spoj **7a** koji u svojoj strukturi sadrži vicinalne amino skupine pokušalo se pripremiti redukcijom azidne skupine uz uvođenje H<sub>2</sub>S u reakcijsku smjesu (Shema 7.).



Shema 7. Pokušaj Priprave spoja **7a**.

Pošto u prethodnim koracima nismo pročišćavali reakcijsku smjesu zbog malih prinosa reakcija, produkt **7a** nismo uspjeli izolirati i karakterizirati FTIR i NMR spektroskopijom. Unatoč tome, smjesa produkata nakon završnog koraka sinteze je kompleksirana sa selenijem. Otopina selenija sa smjesom produkata pokazala je značajno povećanje intenziteta fluorescencije što smo smatrali dokazom da je produkt **7a** sintetiziran (Slika 27.).



Slika 27. Kompleksiranje ciljnog produkta sa selenijem.



# 5. Zaključak

Provedeni sintetski put čiji je cilj bio sinteza novog fluorescentnog indikatora nije u potpunosti bio uspješan. Prva tri koraka su provedena uspješno u kojima smo uspjeli izolirati i karakterizirati produkte **2a**, **3a** i **4a**. U četvrtom koraku, bromiranje spoja **4a** nije bilo i potpunosti učinkovito, nastala je samo mala količina spoja **5a**, koja je bila nedovoljna za identifikaciju FTIR spektroskopijom. Pomoću osjetljivijih tehnika,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopije, uspjeli smo dokazati nastajanje produkta **5a**. Unatoč tome planiranu shemu sinteze smo proveli do kraja ali zbog izuzetno male količine produkte **6a** i **7a** nismo uspjeli pročistiti i izolirati u dovoljnim količinama da bi mogli izvršiti karakterizaciju i određivanje njihove strukture. Kao dokaz nastajanja spoja **7a** napravili smo kompleksiranje selenija i smjese produkata završne reakcije. Smjesa produkata iz završnog koraka nije pokazivala fluorescenciju jakog intenziteta dok je smjesa kompleksirana selenijem imala jaku fluorescenciju. Da bi priprava krajnjeg produkta bila uspješnija mora se izvršiti optimizacija reakcijskih uvjeta u sintezi spoja **5a**.

# 6. Literaturni izvori

- [1] <https://www.lenntech.com/periodic/elements/se.htm> (25.6.2019.)
- [2] A. Sobolev, *Ukr. j. ecol.* **8** (2018), 654-665.
- [3] K. L. Nuttall, *Ann. Clin. Lab. Sci.* **36** (2006), 409-420.
- [4] E. Bem, *Environ. Health Perspect.* **37** (1981), 183-200.
- [5] O. Oster, W. Prellwitz, *Clin. Chim. Acta* **124** (1982), 277-291.
- [6] M. Piaścik, K. Pyrżyńska, E. Bulska, *Chem. Anal.* **50** (2005), 235-247.
- [7] B. Welz, M. Verlinden, *Acta Pharmacol.Toxicol* **59** (1986), 577-580.
- [8] J. A. Fiorino, J. W. Jones, S. G. Capar, *Anal.Chem.* **48** (1976), 120-125.
- [9] M. L. Tracy, G Möller, *Assoc. Off. Anal. Chem.* **73** (1990), 404-410.
- [10] Y. Shimoishi, *J. Chromatogr. A* **136** (1977), 73-83.
- [11] K. L. Cheng, *Anal. Chem.* **28** (1956), 1738-1742.
- [12] J.G. Smith, *Organic Chemistry* 3rd ed, McGraw-Hill, New York, 2011.
- [13] <https://www.chemguide.co.uk/organicprops/aniline/bromine.html> (15.7.2019.)
- [14] J. March, M.B. Smith, *March's Advanced Organic Chemistry*, 6th ed, Wiley Interscience, New Jersey, 2007.
- [15] J. F. Bunnett, E. Roland, *Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions*, Reed College, Portland, Oregon, 1951.
- [16] N. I. Georgiev, M. D. Dimitrova, P. V. Krasteva, V. B. Bojinov, *J. Lumin.* **187** (2017), 383-391.
- [17] S. A. Choi, C. S. Park, O. S. Kwon, H. K. Giong, J. S. Lee, T. H. Ha, C. S. Lee, *Sci.Rep.* **6** (2016), 1-10.
- [18] J. F. Knifton, *J. Org. Chem.* **40** (1975), 519-520.
- [19] P.J.Kocienski, *Protecting groups*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.

Slike iz literaturnog pregleda preuzete su iz sljedećih izvora:

<https://bs.wikipedia.org/wiki/Selen#/media/Datoteka:SeBlackRed.jpg> (Slika 2.)

<http://bioinformatica.upf.edu/2011/projectes11/Ey/introduccion.html> (Slika 3.)

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/nj/c6nj03821b#!divAbstract> (Slika 4.)

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d2757?lang=en&region=HR> (Slika 5.)

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d8001?lang=en&region=HR> (Slika 6.)

[https://en.wikipedia.org/wiki/Arene\\_substitution\\_pattern](https://en.wikipedia.org/wiki/Arene_substitution_pattern) (Slika 8.)

J.G. Smith, Organic Chemistry 3rd ed, McGraw-Hill, New York, 2011. (Slike 7. i 9.)

<https://www.chemguide.co.uk/organicprops/aniline/bromine.html> (Slike 10. i 11.)

J. March, M.B. Smith, March's Advanced Organic Chemistry, 6th ed, Wiley Interscience, New Jersey, 2007. (Slike 12., 14., 15., 16.)

<https://www.masterorganicchemistry.com/2018/08/20/nucleophilic-aromatic-substitution-nas/>  
(Slika 13.)

Strukture spojeva i sheme su izrađene u programu ChemSketch

# 7. Prilozi

Popis oznaka kratica i simbola

AAS atomska apsorpcijska spektroskopija

ICP-AES induktivno spregnuta plazma-atomska emisijska spektrometrija

ICP-MS induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija

GC plinska kromatografija

HGAAS atomska apsorpcijska spektroskopija sa generiranjem hidrida

GFAAS atomska apsorpcijska spektroskopija sa grafitnom peći

EAAS elektrotermalna atomska apsorpcijska spektroskopija

GLC plinsko-tekućinska kromatografija

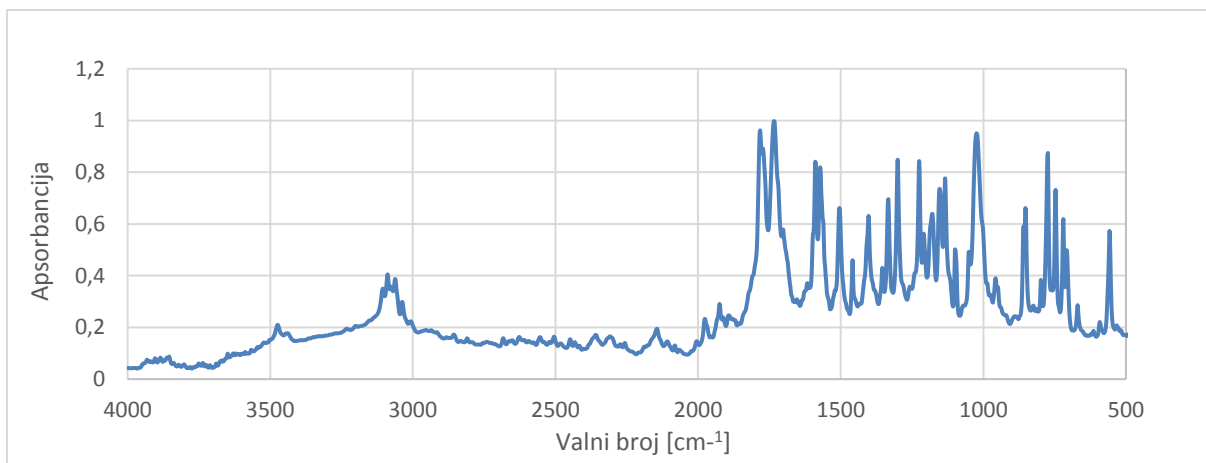
DAN 2,3-diaminonaftalen

DAB 3,3-diaminobenzidin

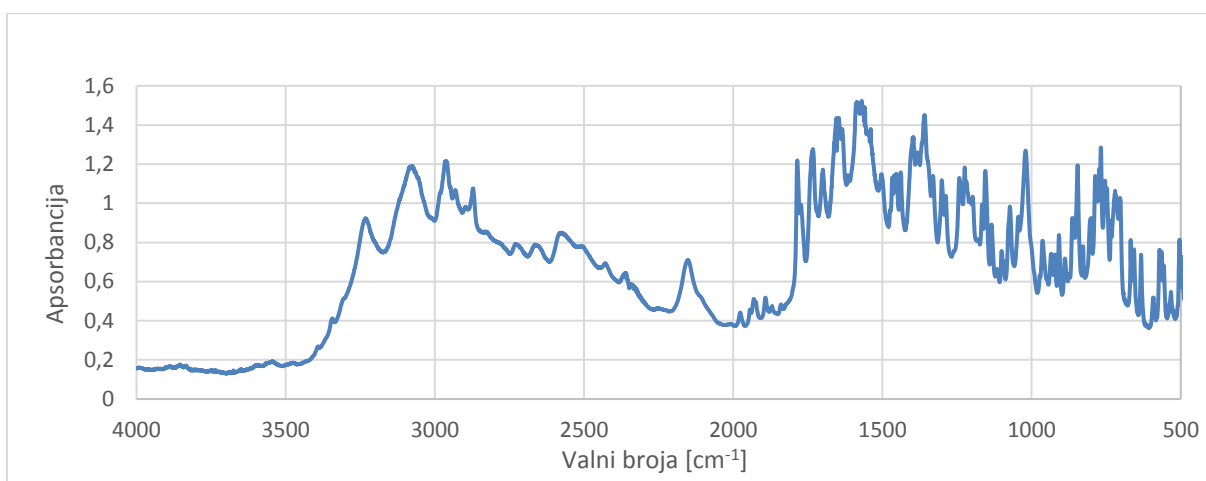
EAS elektrofilna aromatska supstitucija

S<sub>N</sub>Ar aromatska nukleofilna supstitucija

DMF dimetilformamid



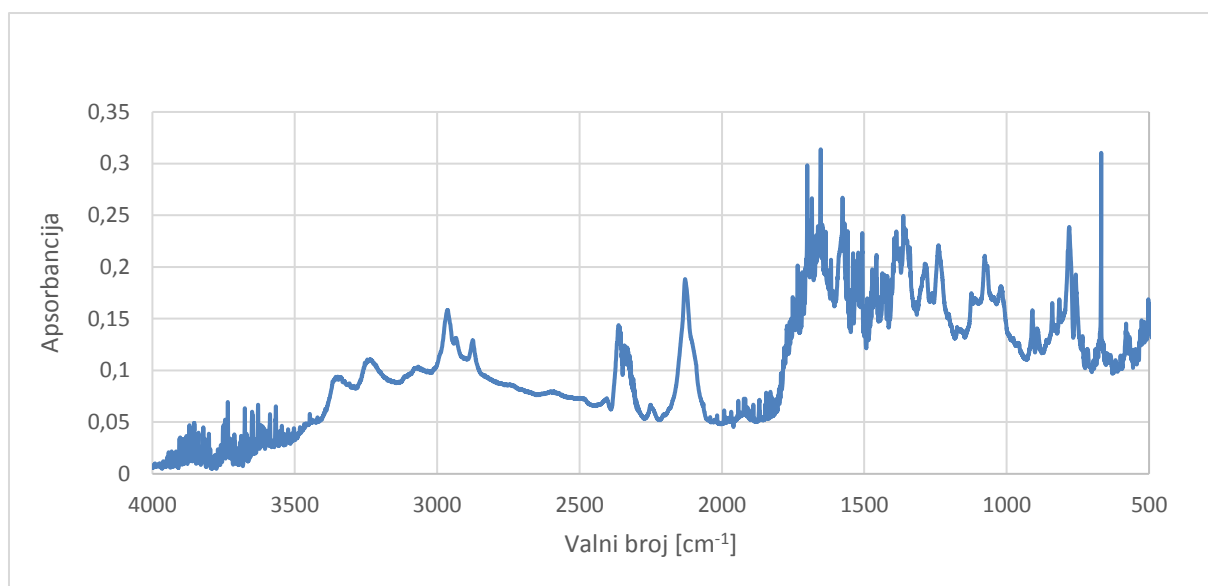
Slika 28. FTIR spektar spoja **1**.



Slika 29. FTIR spektar spoja **2a**.

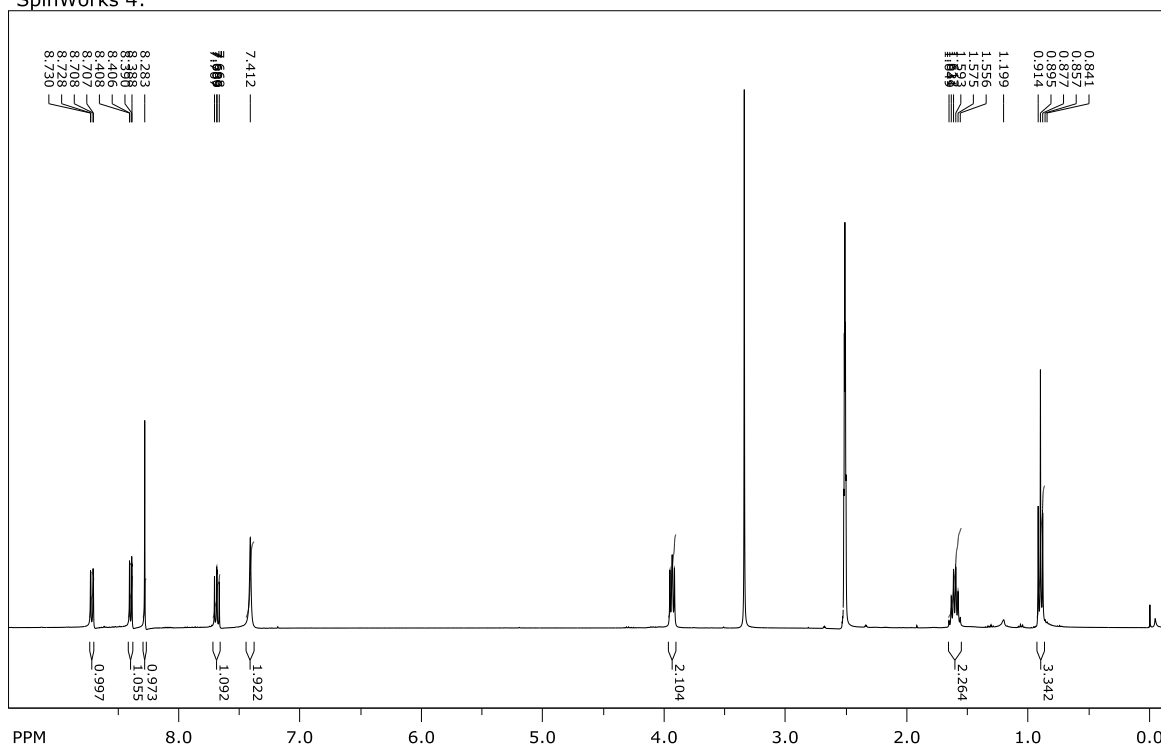


Slika 30. FTIR spektar spojeva **3a** i **4a**.



Slika 31. FTIR spektar spoja **5a**.

SpinWorks 4:

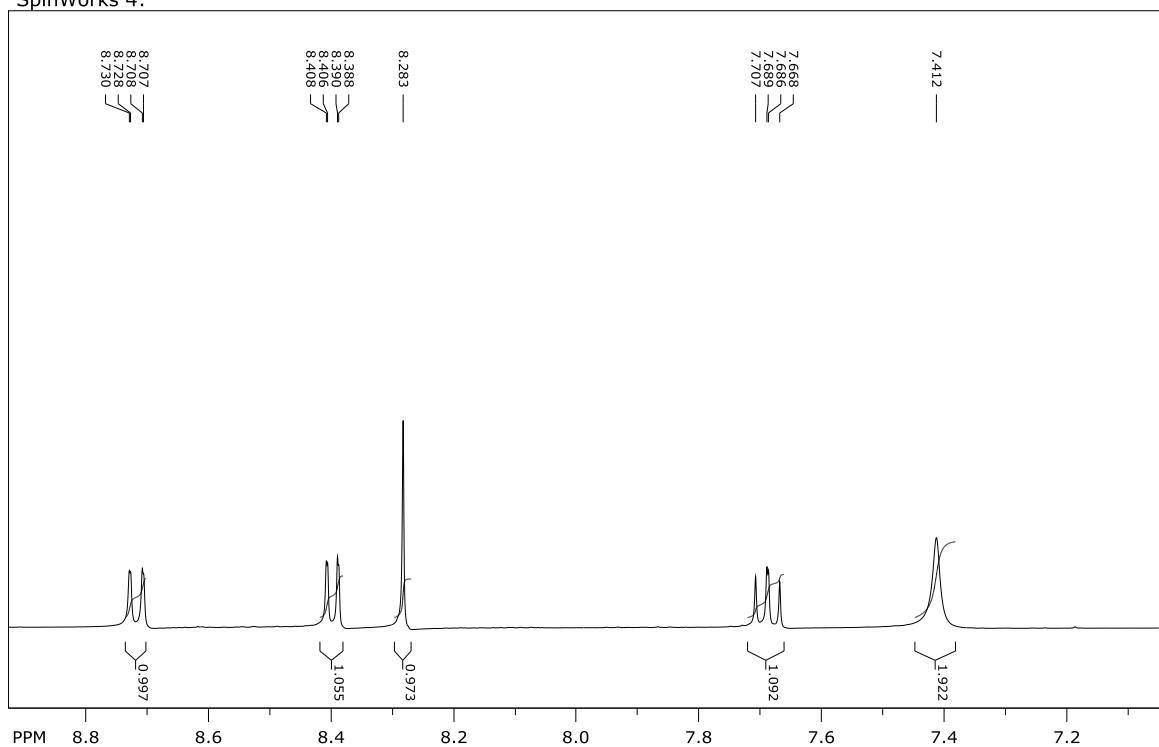


file: F:\NMR-Juric\nh2nh2pr1\1\fid exp: <zg30>  
transmitter freq.: 400.133601 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8012.82 Hz = 20.0254 ppm = 0.122266 Hz/pt  
number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.130000 MHz  
processed size: 65536 complex points  
LB: 0.300 GF: 0.0000

Slika 32.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **5a**

SpinWorks 4:



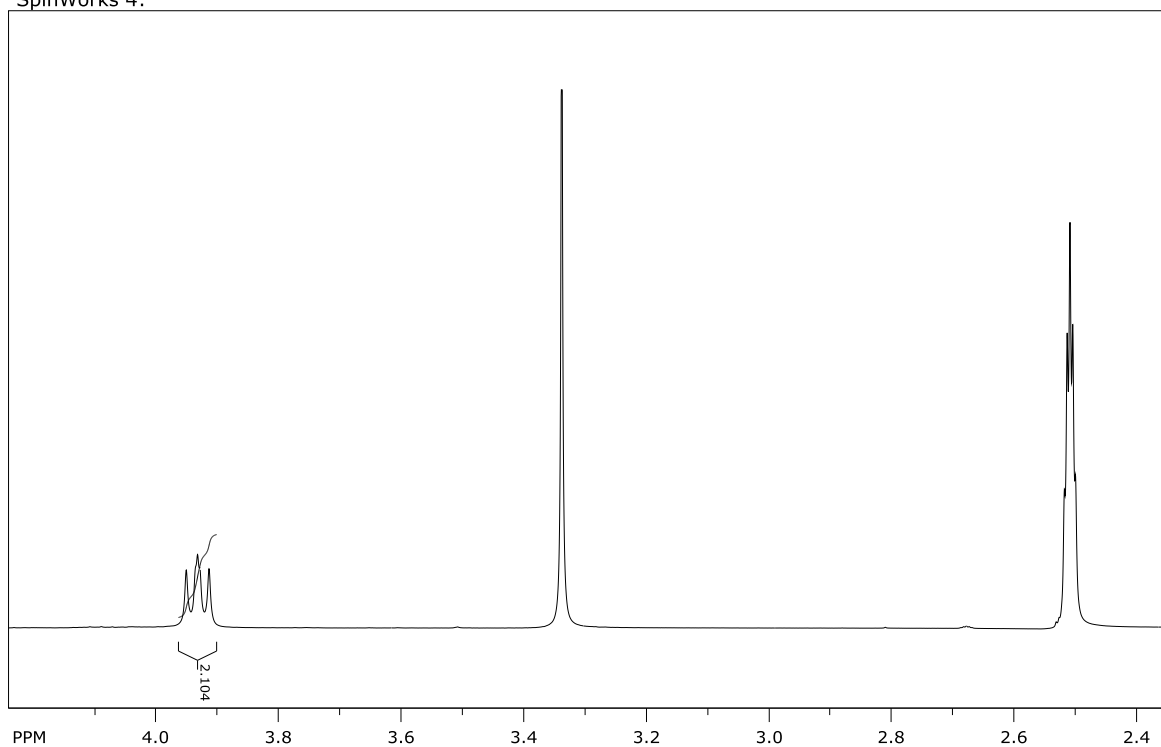
file: F:\NMR-Juric\nh2nh2pr1\1\fid expt: <zg30>  
transmitter freq.: 400.133601 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8012.82 Hz = 20.0254 ppm = 0.122266 Hz/pt  
number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.130000 MHz  
processed size: 65536 complex points  
LB: 0.300 GF: 0.0000

Slika 33.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **5a**



SpinWorks 4:

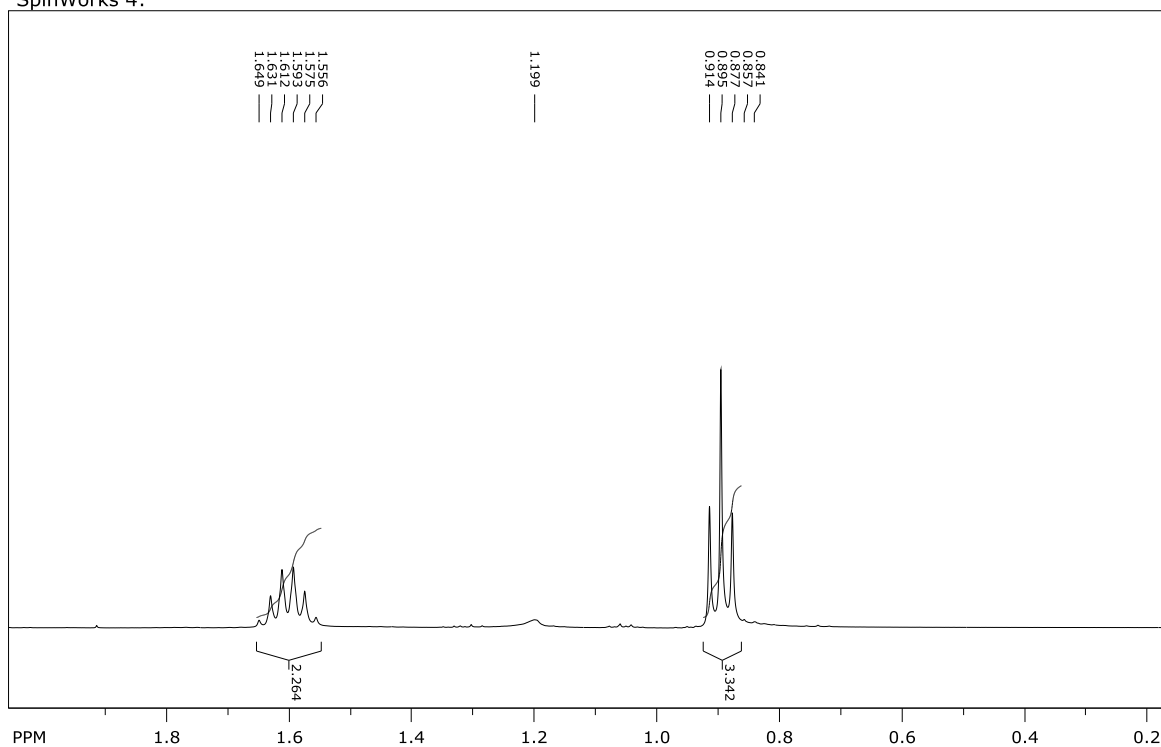


file: F:\NMR-Juric\nh2nh2pr1\1\fid expt: <zg30>  
transmitter freq.: 400.133601 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8012.82 Hz = 20.0254 ppm = 0.122266 Hz/pt  
number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.130000 MHz  
processed size: 65536 complex points  
LB: 0.300 GF: 0.0000

Slika 34.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **5a**

SpinWorks 4:

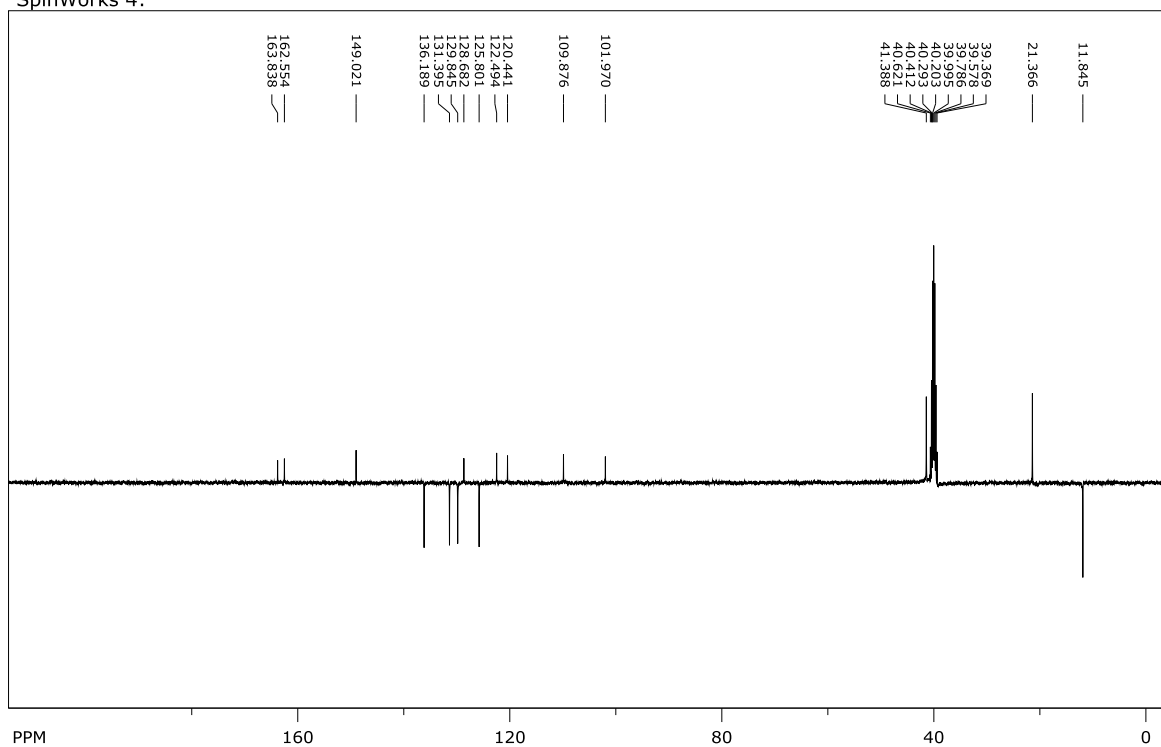


file: F:\NMR-Juric\nh2nh2pr1\1\fid expt: <zg30>  
transmitter freq.: 400.133601 MHz  
time domain size: 65536 points  
width: 8012.82 Hz = 20.0254 ppm = 0.122266 Hz/pt  
number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.130000 MHz  
processed size: 65536 complex points  
LB: 0.300 GF: 0.0000

Slika 35.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **5a**.

SpinWorks 4:



file: D:\Desktop\2\fid exp: <deptqgsp>  
 transmitter freq.: 100.623333 MHz  
 time domain size: 65536 points  
 width: 22058.82 Hz = 219.2218 ppm = 0.336591 Hz/pt  
 number of scans: 2048

freq. of 0 ppm: 100.612769 MHz  
 processed size: 32768 complex points  
 LB: 3.000 GF: 0.0000

Slika 36.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **5a**.